

研究报告

鱼源副乳房链球菌前噬菌体裂解酶 Sply828 的抗菌活性

涂传灯*, 陈凯歌

扬州大学环境科学与工程学院 海洋科学与技术研究所, 江苏 扬州 225127

涂传灯, 陈凯歌. 鱼源副乳房链球菌前噬菌体裂解酶 Sply828 的抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1719-1730

Tu Chuandeng, Chen Kaige. Antibacterial activity of a prophage lysin Sply828 from fish-derived *Streptococcus parauberis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1719-1730

摘要:【背景】副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)是重要的水产病原菌, 该病原菌已逐渐出现新的血清型及多重耐药性状, 因此亟须开发出一种新的抗菌药物用于该病害的防治。研究发现, 前噬菌体编码的裂解酶能够有效地杀死其宿主, 具有良好的抗菌应用前景。【目的】以副乳房链球菌前噬菌体裂解酶为对象, 研究其杀菌宿主谱并优化其裂解活性的条件。【方法】利用 PHASTER 工具对副乳房链球菌菌株 KRS02083 全基因组序列分析发现, 其前噬菌体包含一种裂解酶的基因 *Sply828*; 通过基因克隆、表达和纯化等技术得到裂解酶 Sply828 蛋白; 通过浊度递减实验探究裂解酶 Sply828 对不同细菌的杀菌活性及其最适的裂解条件。【结果】裂解酶 Sply828 对鱼源副乳房链球菌具有最佳的杀菌活性, 并发现该酶对处于指数生长期的细菌杀菌效果最好; 其最适裂解温度为 28 °C, 最适 pH 为 6.2; Ca²⁺和 Mg²⁺对该酶的杀菌活性有促进作用, 但是 Zn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Ni²⁺明显抑制该酶的杀菌活性。【结论】基于全基因组数据分析发现, 前噬菌体裂解酶 Sply828 具有高效、特异杀菌活性, 为防控水产副乳房链球菌病害提供了基础。

关键词: 副乳房链球菌; 前噬菌体; 裂解酶; 裂解活性

Antibacterial activity of a prophage lysin Sply828 from fish-derived *Streptococcus parauberis*

TU Chuandeng*, CHEN Kaige

Marine Science & Technology Institute, College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, Jiangsu, China

Abstract: [Background] *Streptococcus parauberis* is a major aquatic pathogen which has gradually evolved new serotypes and multi-drug resistance. Therefore, it is urgent to develop a new antibacterial

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK20180937)

Supported by: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20180937)

*Corresponding author: E-mail: chuandeng.tu@yzu.edu.cn

Received: 2021-10-18; Accepted: 2022-01-12; Published online: 2022-01-28

drug for the prevention and treatment of the disease caused by this pathogen. Studies have demonstrated that a lysin encoded by a prophage can effectively kill the host and has a good prospect of antibacterial application. **[Objective]** In this paper, we investigated the host spectrum of the prophage lysin from *S. parauberis* and optimized the conditions for the lytic activity. **[Methods]** We used bioinformatics tools to analyze the whole genomic sequence of the *S. parauberis* strain KRS02083 and discovered a lysin gene *Sply828*. By gene cloning, protein expression and purification, we obtained the lysin Sply828. We then evaluated the activities against different bacteria and the optimal lysis conditions of Sply828 by performing the turbidity decrease assay. **[Results]** Sply828 displayed the best activity against fish-derived *S. parauberis* and exhibited the highest activity against the bacteria in the exponential growth phase. This enzyme had the highest activity at 28 °C and pH 6.2, and its activity can be improved by Ca^{2+} and Mg^{2+} while inhibited by Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , and Ni^{2+} . **[Conclusion]** The prophage lysin Sply828 existing in the genomic sequence of *S. parauberis* possesses efficient and specific bactericidal activity, providing a preliminary basis for the prevention and control of the disease caused by *S. parauberis*.

Keywords: *Streptococcus parauberis*; prophage; lysin; lytic activity

副乳房链球菌是水产病原菌，可引起大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、银鲫(*Carassius gibelio*)、白梭吻鲈(*Sander lucioperca*)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)等多种海水和淡水经济鱼类的链球菌病，造成行业重大损失^[1-6]。目前，该病原菌已逐渐出现新的血清型及多重耐药性状^[7-9]，因此亟须寻求新的防控策略。

噬菌体裂解酶是一类肽聚糖水解酶，其所含的催化结构域能切割肽聚糖中的化学键，破坏宿主菌的细胞壁结构，造成细菌裂解死亡^[10]。该类酶具有高效、特异杀菌及相对安全等诸多优点，被认为是可替代抗生素的新型抗菌剂^[11-13]。近年来，随着测序技术及生物信息学的发展，发现在多种链球菌的基因组中存在前噬菌体序列，该序列编码裂解酶。目前，已有多种具有杀菌活性的裂解酶被鉴定^[14-18]，但在副乳房链球菌中前噬菌体裂解酶还未见报道。

本文对副乳房链球菌 KRS02083 菌株基因

组进行了前噬菌体预测，发现其前噬菌体序列中编码一种裂解酶的基因(*Sply828*)。为了研究该裂解酶的功能并探究其杀菌活性的最适条件，利用分子生物学技术对该裂解酶进行了基因克隆、诱导表达及纯化，同时利用浊度递减实验分析该酶裂解活性的宿主谱并进一步探讨了温度、pH 和金属离子等因素对该酶杀菌活性的影响。本研究结果发现，裂解酶 Sply828 能够高效、特异地杀死副乳房链球菌，从而为防控该病原菌引起的病害提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

质粒 pET-28a(+) 和鱼源副乳房链球菌 (*Streptococcus parauberis*) (KRS02083、NUF1003、NUF1071、NUF1032、2007-1、NUF1095)、鱼源格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*) NUF18 为本实验室保存；枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6633、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923 和紫色杆菌(*Chromobacterium*

violaceum) 12472 由缪莉实验室提供; 拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*) Y4 和维氏气单胞菌 (*Aeromonas veronii*) DJ 由张晓君实验室提供; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 主要试剂和仪器

2 \times Phanta Mix、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 限制性核酸内切酶 *Eco*R I、*Hind* III 和 T4 DNA 连接酶 (T4 DNA Ligase), Thermo 公司; Todd-Hewitt Broth (THB), 青岛海博生物技术有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 酶标仪, 上海三科仪器有限公司; 蛋白纯化系统 (NCGTM chromatography system), Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 裂解酶 Sply828 的生物信息学分析

利用 PHASTER 工具 (<http://phaster.ca/>) 对宿主菌 KRS02083 菌株全基因组 (登录号: CP082783) 序列进行分析, 发现其前噬菌体编码裂解酶基因, 命名为 *Sply828*; 通过 ExPASy 网站 (https://web.expasy.org/compute_pi/) 预测裂解酶 Sply828 分子量及其等电点; 使用 BLASTp 在 NCBI 上进行同源序列搜索, 并用 ClustalW 2.1 和 MEGA 7.0 软件分别进行序列比对和邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统发育树; 通过 Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 预测和分析裂解酶 Sply828 的结构和功能^[19]。

1.2.2 裂解酶 Sply828 的基因克隆、表达与纯化

裂解酶 Sply828 的基因克隆: 以宿主菌 KRS02083 基因组 DNA 为模板, 利用 2 \times Phanta Mix PCR 扩增基因 *Sply828*, 引物为 F (5'-CCG GAATTCATGGTTGCATACCTTGATTTT-3') 和

R (5'-CCCAAGCTTTTATATCTTATTAAGTTTGA-3'), 其中下划线序列分别为限制性核酸内切酶 *Eco*R I 和 *Hind* III 的酶切位点。PCR 反应体系: 引物 F (10 μ mol/L) 2 μ L, 引物 R (10 μ mol/L) 2 μ L, KRS02083 基因组 DNA (50 ng/ μ L) 2 μ L, 2 \times Phanta Mix 25 μ L, 灭菌 ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。取 2 μ L PCR 扩增产物采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

将 pET-28a(+) 质粒和 PCR 产物分别用 *Eco*R I 和 *Hind* III 进行双酶切 (37 $^{\circ}$ C、2 h), 然后利用胶回收试剂盒回收酶切产物, 回收后的产物用 T4 DNA 连接酶连接 (22 $^{\circ}$ C、2 h)。将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 30 mg/L 卡那霉素的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。在 LB 平板上挑取单克隆, 菌液 PCR 鉴定成功后, 采用质粒提取试剂盒提取 pET-28a(+)-*Sply828* 质粒, 然后测序验证。

裂解酶 Sply828 的蛋白表达和纯化: 将 pET-28a(+)-*Sply828* 转化至感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3), 活化单菌落, 按 1% 接种到 500 mL LB 液体培养基 (含 30 mg/L 卡那霉素), 37 $^{\circ}$ C、140 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5–0.6, 加入终浓度为 1 μ mol/L IPTG 室温诱导蛋白表达 12 h。4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 15 min 收集诱导后菌体, 弃上清, 用 Ni 亲和柱 buffer A (10% 甘油、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-Cl 8.0、50 mmol/L 咪唑) 溶液重悬菌体, 然后利用超声波 (功率 20%, 超声 3 s, 间隔 3 s) 破碎菌体。破碎菌体 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min 收集上清液。利用 NCGTM chromatography system 将上清液上样至 Ni 亲和柱, 然后以 buffer B (10% 甘油、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L Tris-Cl 8.0、500 mmol/L 咪唑) 进行梯度洗脱, 收集裂解酶 Sply828 蛋白组分, 利用 12% SDS-PAGE 电泳

分析该蛋白的表达与纯化结果。

1.2.3 裂解酶 Sply828 对不同细菌的杀菌活性分析

将培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.6 左右)的鱼源副乳房链球菌(KRS02083、NUF1003、NUF1071、NUF1032、NUF1095 和 2007-1)、格氏乳球菌 NUF18、枯草芽孢杆菌 ATCC 6633、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、紫色杆菌 12472、拟态弧菌 Y4 和维氏气单胞菌 DJ 的菌液于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 20 mmol/L 乙酸铵缓冲液(pH 6.2)重悬菌体,再次离心、重悬 3 次,并使菌液 OD_{600} 为 0.5–0.6。采用浊度递减实验^[15]测定裂解酶 Sply828 的杀菌活性,具体方法如下:在 96 孔板中加入 88 μ L 制备好的菌液、2 μ L Ca^{2+} (终浓度 2 mmol/L)和 10 μ L 裂解酶 Sply828 (终浓度 35 μ g/mL),以乙酸铵缓冲液为对照,28 °C 反应 30 min 后,用酶标仪于 600 nm 测定 OD 值。实验重复 3 次,数据结果取平均值。

1.2.4 裂解酶 Sply828 对不同生长时期细菌的杀菌活性分析

取培养过夜的宿主菌 KRS02083 菌液,按 1%接种至 60 mL THB 液体培养基,分装到 11 个离心管中,每管 5 mL 菌液,分别培养 1.5、3、4、5、6、7、8、10、12 和 14 h 后于 600 nm 处测定菌液吸光度;以测定的菌液吸光度为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制生长曲线。参照 1.2.3 的浊度递减实验方法,研究裂解酶 Sply828 对处于适应期、对数期及稳定期的 KRS02083 杀菌活性。

1.2.5 裂解酶 Sply828 浓度对其杀菌活性的影响

参照 1.2.3 浊度递减实验方法,分别添加不同终浓度的裂解酶 Sply828 (2.5、5、10、20、35 和 50 μ g/mL)至浊度递减实验体系,探究该裂解酶的最低有效杀菌浓度。

1.2.6 温度和 pH 对裂解酶 Sply828 杀菌活性的影响

参照 1.2.3 浊度递减实验方法,测试不同温度(4、15、28、37、45、55 和 65 °C)条件下裂解酶 Sply828 的杀菌活性,探明该酶的最适杀菌温度;测试不同 pH 值(4.2、5.2、6.2、7.2、8.2 和 9.2)裂解酶 Sply828 的杀菌活性,探讨该酶的最适杀菌 pH。

1.2.7 二价金属离子对裂解酶 Sply828 杀菌活性的影响

参照 1.2.3 浊度递减实验方法,分别测试终浓度为 2 mmol/L Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对裂解酶 Sply828 杀菌活性的影响,并以终浓度为 2 mmol/L 的 EDTA 和未额外添加二价金属离子的组分(CK)为对照;同时测定不同 Ca^{2+} 离子浓度下(0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mmol/L)裂解酶 Sply828 的杀菌活性。

1.2.8 最优条件下裂解酶 Sply828 杀菌活性分析

根据单因素条件下裂解酶 Sply828 杀菌活性的结果,从而获得该酶杀菌活性的最优条件。以对数期宿主菌 KRS02083 为底物,参照 1.2.3 浊度递减实验方法,在最优条件下对该酶杀菌活性进行测定,并分析最优条件下与各单因素条件下该酶的最高杀菌活性的差异性。

1.2.9 数据分析

利用 GraphPad Prism 7.0 软件绘图和分析,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Dunnett's test 检验不同条件下裂解酶杀菌活性的差异, $P < 0.05$ 代表具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 裂解酶 Sply828 的生物信息学分析

对宿主菌副乳房链球菌 KRS02083 基因组序列分析发现,基因 *Sply828* 的开放阅读框含有

1 257 个碱基, 编码 418 个氨基酸, 为一种裂解酶。ExPASy 预测该蛋白的分子量为 46.2 kDa, 等电点为 6.38。与同源蛋白的氨基酸序列比对结果发现, 裂解酶 Sply828 与乳房链球菌裂解酶(WP_046390798.1)具有 74.5%的等同性, 表明两者具有较高的一致性, 但与其他短尾和长尾噬菌体的裂解酶一致性均低于 47.1%。Phyre2 预测裂解酶 Sply828 结构域结果显示(图 1), 该酶含 1 个 Amidase-2 结构域(AA 182-322)和 1 个细胞结合结构域(cell binding domain, CBD)(AA 352-418), 表明该酶具有典型的革兰氏阳性菌裂解酶催化域和结合域的组合模块。

为了阐明裂解酶 Sply828 与其他已报道的裂解酶的进化关系, 本文构建了相应的系统发育树(图 2), 结果发现, 这 8 种酶进化成 2 个独立的分支, 其中裂解酶 Sply828 与链球菌噬菌体 Str-PAP-1 裂解酶(YP_009188468.1)和猪肠链球菌酰胺酶(WP_164683440.1)聚为一支。

2.2 裂解酶 Sply828 蛋白的表达与纯化

裂解酶 Sply828 蛋白的表达与纯化结果如图 3 所示, 相较于诱导前, 加入 IPTG 诱导后表达菌株明显多出一条蛋白条带, 大小介于 42-53 kDa, 正好与该蛋白的大小(46.2 kDa)相吻合。超声波破碎诱导后的上清液中目的蛋白组分与诱导后的目的蛋白亮度基本一致, 说明其为可溶性蛋白, 并通过亲和层析获得较纯的目的蛋白。将纯化得到的裂解酶 Sply828 蛋白透析到贮存 buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 6.2, 1 mmol/L DTT, 50 mmol/L NaCl, 50%甘油)中, 经 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测得其浓度为 1.4 mg/mL。

2.3 裂解酶 Sply828 对不同细菌的杀菌活性

裂解酶 Sply828 对不同细菌的杀菌活性结

果如图 4 所示, 发现该酶对 6 株鱼源副乳房链球菌 I 型 KRS02083、NUF1003 和 NUF1071, II 型 NUF1032, 未分型 2007-1 和 NUF1095 的杀菌效率分别为 66%±3%、66%±1%、61%±1%、68%±2%、71%±1%和 67%±1%。另外, 该酶对革兰氏阳性菌属的格氏乳球菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和革兰氏阴性菌属的紫色杆菌、拟态弧菌、维氏气单胞菌无杀菌活性。上述的研究结果表明, 裂解酶 Sply828 的杀菌活性具有较好的宿主特异性。

2.4 裂解酶 Sply828 对不同生长时期细菌的杀菌活性

裂解酶 Sply828 对宿主菌 KRS02083 具有较好的杀菌效果, 因此测试了该菌株的生长曲线(图 5A)。结果表明, 宿主菌 KRS02083 在 0-4 h 时处于生长适应期, 4-8 h 时处于对数期, 8-14 h 时处于生长稳定期。

然后, 分别选取培养 2、6 和 12 h 的培养物进行浊度递减实验, 结果如图 5B 所示, 以培养物处于适应期为研究对象时, 裂解酶 Sply828 的杀菌活性为 50%; 同时, 该酶对处于指数生长期的裂解活性达 64%以上, 表明该酶对生长在对数期的菌株杀菌效果较好。然而, 该酶对处于稳定期的细菌仅有 14%的杀菌活性, 说明其对稳定期的细菌杀菌效果较差。

2.5 裂解酶 Sply828 蛋白浓度对其杀菌活性的影响

裂解酶 Sply828 蛋白浓度对其杀菌活性的影响如图 6 所示, 当裂解酶 Sply828 的浓度低于 20 $\mu\text{g/mL}$ 时, 该酶的杀菌活性低于 56%; 当酶的浓度为 35 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其杀菌活性为 64%; 而当酶的浓度由 35 $\mu\text{g/mL}$ 上升至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 其杀菌活性仅提高 2%, 表明该酶的较适杀菌浓度为 35 $\mu\text{g/mL}$ 。

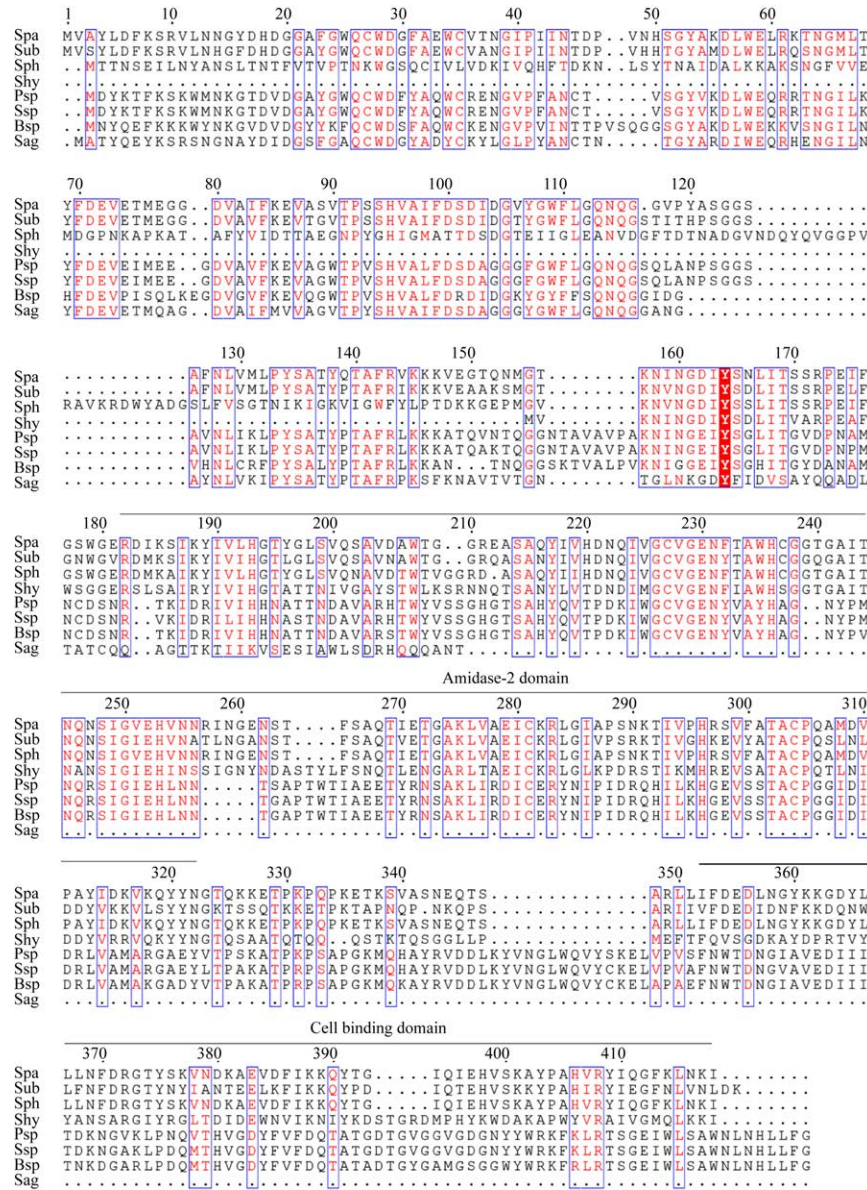


图 1 裂解酶 Sply828 与同源蛋白氨基酸序列比对结果 Spa: 副乳房链球菌(NCBI 序列登录号: 0K020191); Sub: 乳房链球菌(NCBI 序列登录号: WP_046390798.1); Sph: 链球菌噬菌体(NCBI 序列登录号: YP_009188468.1); Shy: 猪肠链球菌(NCBI 序列登录号: WP_164683440.1); Psp: 短尾噬菌体(NCBI 序列登录号: DAO83705.1); Ssp: 长尾噬菌体(NCBI 序列登录号: DAI95971.1); Bsp: 细菌噬菌体(NCBI 序列登录号: DAH19967.1); Sag: 无乳链球菌(NCBI 序列登录号: RRA73500.1)

Figure 1 Alignment of amino acid sequence of the lysin Sply828 and its homologous proteins. Spa: *Streptococcus parauberis* (NCBI sequence accession No.: 0K020191); Sub: *Streptococcus uberis* (NCBI sequence accession No.: WP_046390798.1); Sph: *Streptococcus* phage (NCBI sequence accession No.: YP_009188468.1); Shy: *Streptococcus hyointestinalis* (NCBI sequence accession No.: WP_164683440.1); Psp: Podoviridae (NCBI sequence accession No.: DAO83705.1); Ssp: Siphoviridae (NCBI sequence accession No.: DAI95971.1); Bsp: Bacteriophage (NCBI sequence accession No.: DAH19967.1); Sag: *Streptococcus agalactiae* (NCBI sequence accession No.: RRA73500.1).

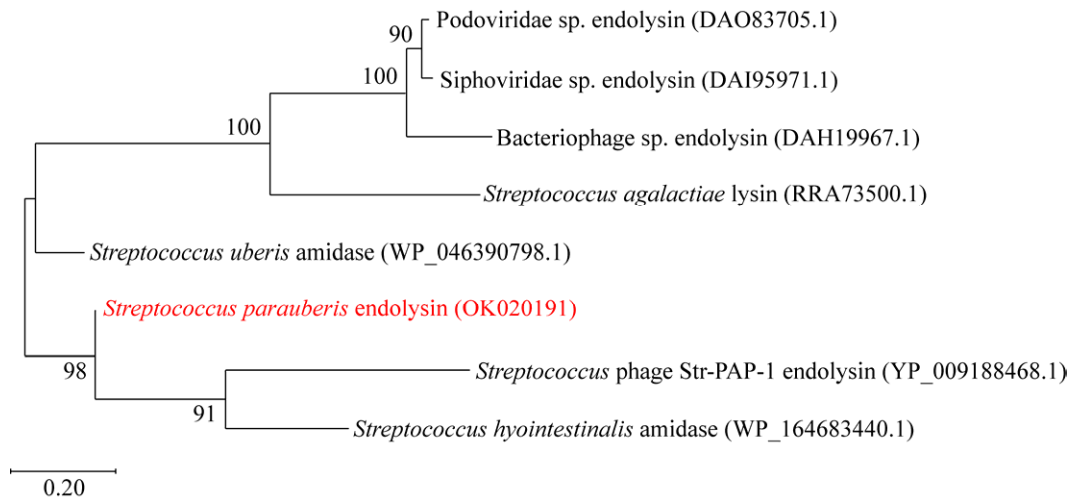


图 2 裂解酶 Sply828 系统发育树 节点处的数字代表 bootstrap 置信度百分比值(1 000 次重复); 括号中为相应的蛋白 GenBank 中的登录号; 标尺表示 20% 的序列差异, 标尺越短代表亲缘关系越近

Figure 2 Phylogenetic analysis of the lysin Sply828. The numbers at the nodes represent the bootstrap values (out of 1 000 bootstrap replications); the corresponding protein accession number in GenBank is shown in brackets; the scale bar represents a 20% sequence difference, the shorter the ruler, the closer the kinship.

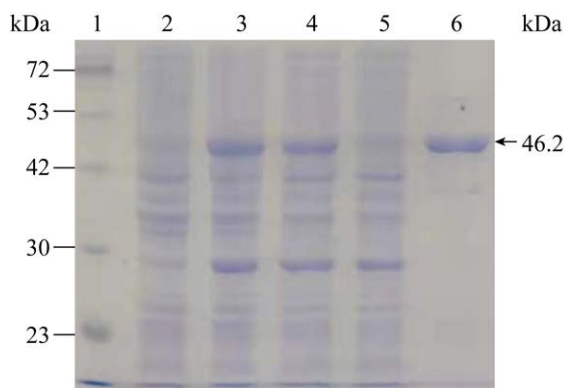


图 3 裂解酶 Sply828 的表达与纯化 1: PageRuler™ 蛋白预染 Ladder; 2: 诱导前的细菌总蛋白; 3: 诱导后的细菌总蛋白; 4: 超声破碎后的上清液; 5: 穿透组分; 6: 纯化的 Sply828 蛋白

Figure 3 Expression and purification of the lysin Sply828. 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 2: Total bacterial protein before induction; 3: Total bacterial protein after induction; 4: Supernatant after sonication; 5: Flow through fraction; 6: Purified protein Sply828.

2.6 温度和 pH 对裂解酶 Sply828 杀菌活性的影响

温度对裂解酶 Sply828 杀菌效果的影响如图 7A 所示, 当温度在 4–37 °C 时, 该酶的杀菌活性保持在 58% 以上, 而且最适杀菌温度为

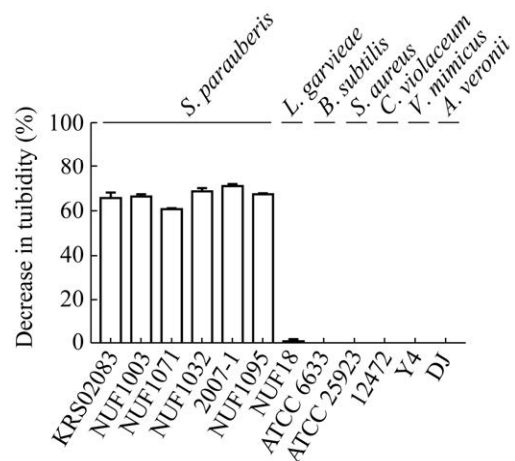


图 4 裂解酶 Sply828 对不同细菌的杀菌活性

Figure 4 The bactericidal activity of the lysin Sply828 against different bacteria.

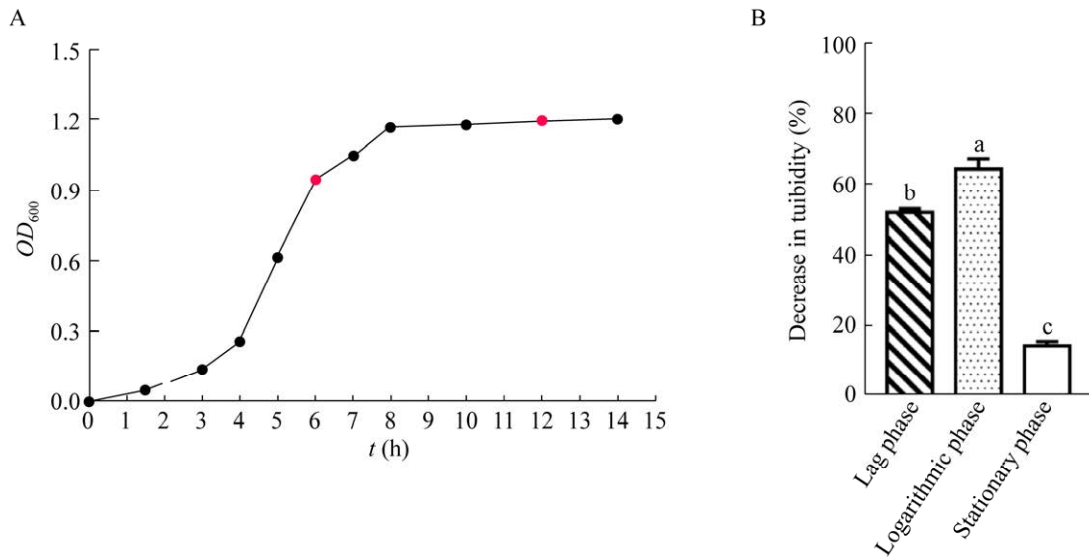


图 5 KRS02083 的生长曲线(A)和裂解酶 Sply828 对处于不同生长阶段细菌的杀菌活性(B) A: 2、6 和 12 h 处分别代表适应期、指数期和稳定期的收菌时间点; B: 不同小写字母代表组间具有显著性差异($P<0.05$)

Figure 5 Growth curve of KRS02083 (A) and the bactericidal activity of the lysin Sply828 against bacteria collected under different growth stages (B). A: 2, 6 and 12 h represent the time points for collecting bacteria at lag, logarithmic and stationary phase, respectively; B: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

28 °C。当温度在 45、55 和 65 °C 时, 该酶的杀菌活性分别下降为 26%、17%和 12%, 说明该酶在高温环境下不具有较好的杀菌效果。

裂解酶 Sply828 杀菌活性与 pH 值的关系如图 7B 所示, 当 pH 值为 6.2–7.2 时, 该酶能够维持 57%以上的杀菌活性, pH 值为 6.2 时该酶的杀菌效果最佳; 当 pH 值为 8.2 时, 该酶的杀菌活性为 34%; 当 pH 值<5.2 或>9.2 时, 该酶的杀菌活性低于 16%。

2.7 二价金属离子对裂解酶 Sply828 杀菌活性的影响

二价金属离子对裂解酶 Sply82 杀菌活性的影响如图 8A 所示, 研究发现不加金属离子时, 该酶表现出 15%的杀菌活性, 而添加 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 时, 该酶失去了杀菌活性, 表明 Zn^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 具有明显抑

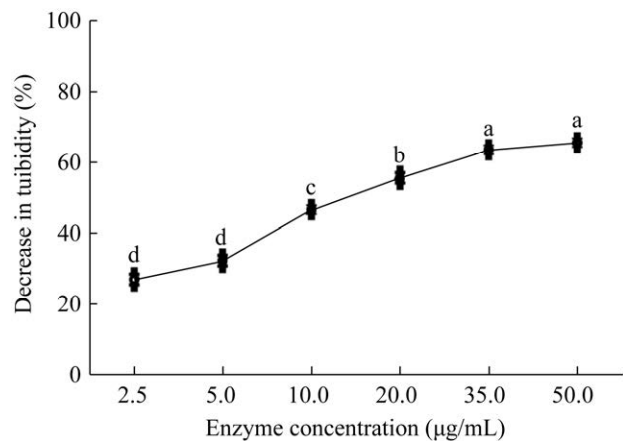


图 6 裂解酶 Sply828 蛋白浓度对其杀菌活性的影响 不同小写字母代表组间具有显著性差异($P<0.05$)

Figure 6 The effect of the lysin Sply828 concentration of its bactericidal activity. Different lowercase letters in figure indicate significant difference ($P<0.05$).

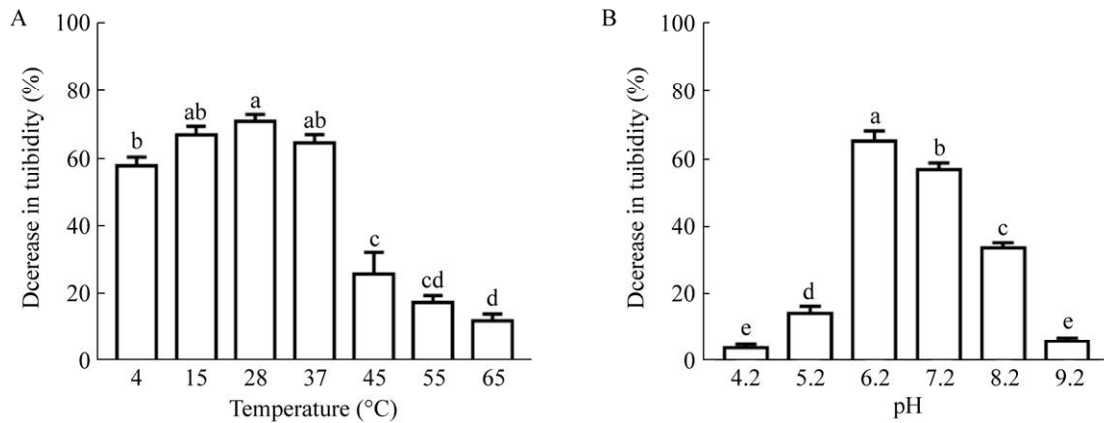


图 7 温度(A)和 pH (B)对裂解酶 Sply828 杀菌活性的影响 不同小写字母代表组间具有显著性差异 ($P<0.05$)

Figure 7 Effects of temperatures (A) and pH (B) on the bactericidal activity of the lysin Sply828. Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

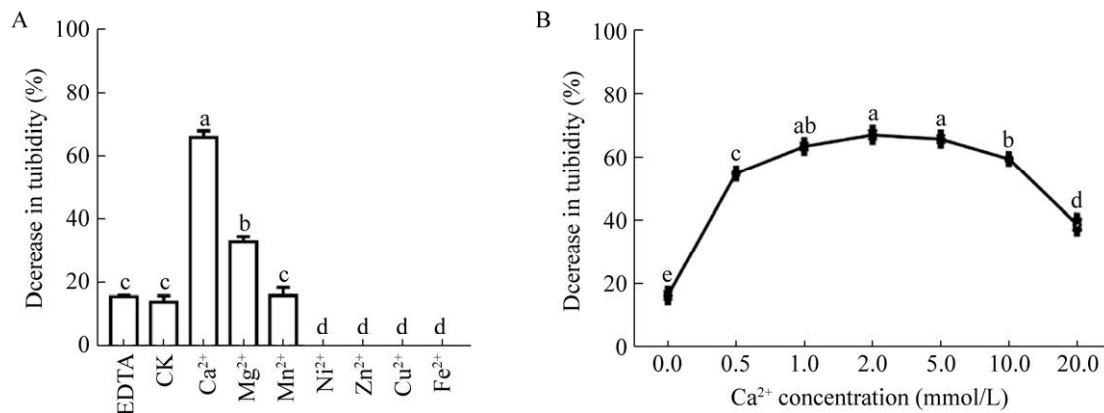


图 8 二价金属离子(A)和 Ca²⁺浓度(B)对裂解酶 Sply828 杀菌活性的影响 CK: 反应中不额外添加二价金属离子; 不同小写字母代表组间具有显著性差异 ($P<0.05$)

Figure 8 Effects of divalent metal ions (A) and Ca²⁺ concentration (B) on the bactericidal activity of the lysin Sply828. CK: The traction without a divalent cation; Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

制该酶活性的作用。与对照相比, EDTA 和 Mn²⁺存在时, 该酶具有相似的杀菌活性。然而, Mg²⁺的添加使得该酶杀菌活性达到 33%, 表明 Mg²⁺促进了该酶的杀菌活性。同时, Ca²⁺存在时该酶的杀菌活性达到 66%, 说明 Ca²⁺是该酶杀菌的最佳二价金属离子。

不同 Ca²⁺浓度对裂解酶 Sply828 杀菌活性

的影响结果发现(图 8B), 当 Ca²⁺浓度低于 0.5 mmol/L 或高于 10.0 mmol/L 时, 其杀菌活性低于 59%; 当 Ca²⁺浓度介于 1.0–5.0 mmol/L 时, 该酶的杀菌活性维持在 63%以上, 表明该酶杀菌的最适 Ca²⁺浓度为 1.0–5.0 mmol/L。

2.8 最优条件裂解酶 Sply828 杀菌活性分析

基于上述单因素条件下裂解酶 Sply828 杀

菌活性的结果, 我们获得该酶杀菌活性的最优条件为酶浓度为 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 温度为 28 $^{\circ}\text{C}$, pH 值为 6.2 和 2 mmol/L Ca^{2+} 存在。在该最优条件下, 该酶对宿主菌 KRS02083 的杀菌活性达到 67% \pm 2%, 与各个单因素条件下该酶的最高杀菌活性(64% \pm 3%)–(70% \pm 2%)相比, 不存在显著性差异。

3 讨论与结论

近年来, 应用噬菌体裂解酶对抗病原细菌成为研究热点, 其主要聚焦医疗、食品和农业等领域^[10]。在水产养殖方面, 已有针对弧菌病害的研究报道^[20-21], 而副乳房链球菌是革兰氏阳性菌, 由其引起的养殖病害及相关的耐药等问题已日趋严重^[9], 本研究从该病原菌中鉴定到具有较强杀死宿主菌活性的前噬菌体裂解酶 Sply828, 从而为应对革兰氏阳性病原菌的防控提供了策略。

该裂解酶对不同血清型的副乳房链球菌都具有较高的裂解活性, 而对格氏乳球菌的活性较低, 表明其具有较好的宿主特异性, 这种特异性提示其对正常菌群的影响较低, 这是其相较于抗生素的优势之一^[11]。然而, 水产养殖动物还面临其他多种致病链球菌的威胁^[22], 因此, 继续发现具有相对广谱杀菌活性的裂解酶及通过基因工程技术表达嵌合酶是今后努力的方向^[23-24]。本研究中 Sply828 对处于对数生长期的细菌具有最高的杀菌活性, 类似的现象在其他裂解酶中也有报道, 如裂解酶 PlySK1249 和 B30 对指数生长期细菌的杀菌活性要明显优于稳定期的细菌^[16,25], 这种差异可能是由于不同生长阶段细菌细胞壁结构的稳定性及相关蛋白和多糖数量的差异造成的^[25]。水环境中由于营养成分的限制, 细菌处于对数生长期的概率较低, 因此如何在实际应用中有效杀菌需要进一

步探索。裂解酶 Sply828 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 以下保持较高的杀菌活性, 随着反应温度上升活性显著下降, 表明其是一类热稳定性相对低的裂解酶, 这与金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)裂解酶 LysGH15 相似^[26], 这一现象可能与宿主生存环境的温度有关^[27]。Sply828 具有较窄的 pH 适应范围(pH 6.2–8.2), 这一特性在裂解酶 Cpl-1 中同样被报道^[28], 而具有较广的 pH 适应性的裂解酶也存在^[29], 这种适应性与其氨基酸组成、二级结构、化学键、蛋白质表面结构和活性位点等密切相关^[30]。金属离子通常在酶的催化活性和结构维持中扮演重要角色, 如裂解酶 phi11 和 LysGH15 发挥裂解活性依赖金属离子^[31-32]。为阐明确切的作用机制, Gu 等在 LysGH15 蛋白的晶体结构中明确了 CHAP 催化域的钙离子结合位点和 Amidase-2 催化域的锌离子结合位点, 并结合定点突变的结果, 证实了这 2 种金属离子在 LysGH15 发挥活性中的重要作用^[32]。Sply828 的 Amidase-2 结构域有预测的 Zn^{2+} 结合残基, 实验中添加 2.0 mmol/L 的 Zn^{2+} 抑制了该裂解酶的活性, 而添加相同浓度的 Ca^{2+} 其活性最高, 该现象的分子机制值得进一步深入研究。

生物信息学分析可用于蛋白的功能预测, 为作用机理的研究设计提供依据。保守结构域和三级结构预测都指明 Sply828 含 Amidase-2 结构域, 暗示其可能具有 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶活性, 切割细菌细胞壁中 N-乙酰胞壁酰基和 L-氨基酸之间的酰胺键; 或者也可能具有类似于 PLY118 和 PLY500 的肽酶活性^[33]。虽然保守结构域数据库 (Conserved Domains Database) 中未能预测到 Sply828 的细胞结合域, 但通过三级结构预测, 在 97.4% 的置信度上提示 C 端具有类似 Lys170 的 CBD 结构域^[34]。通常, 革兰氏阳性菌的裂解酶都含有催化域和结合域的组合模块^[35], 因此, 后续需要通过以副

乳房链球菌的细胞壁为底物阐明 Sply828 中 Amidase-2 结构域的催化机理, 结合构建 C 端 CBD 与绿色荧光蛋白的融合蛋白来明确该裂解酶的作用机理^[36]。

本文在水产革兰氏阳性病原菌中鉴定到一种具有高效、特异杀菌活性的裂解酶, 虽然其作用机理还未阐明, 但该发现为应用噬菌体裂解酶防控相关病害提供了基础。

致谢: 感谢扬州大学张立奎副教授对本论文的修改; 感谢张晓君教授和缪莉副教授提供的菌株。

REFERENCES

- [1] Domeénech A, Derenaández-Garayzábal JF, Pascual C, Garcia JA, Cutuli MT, Moreno MA, Collins MD, Dominguez L. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*[J]. Journal of Fish Diseases, 1996, 19(1): 33-38
- [2] Kanai K, Yamada M, Meng F, Takahashi I, Nagano T, Kawakami H, Yamashita A, Matsuoka S, Fukuda Y, Miyoshi Y, et al. Serological differentiation of *Streptococcus parauberis* strains isolated from cultured Japanese flounder in Japan[J]. Fish Pathology, 2009, 44(1): 33-39
- [3] Lee CH, Kim PY, Ko CS, Oh DC, Kang BJ. Biological characteristics of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*, in JeJu[J]. Journal of fish pathology, 2007, 20(1): 33-40
- [4] Hanoğlu Z, Uçar FB, Savaşer S. Isolation and identification of *Streptococcus parauberis* from freshwater fish in Turkey[J]. Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research, 2017: 175-182
- [5] Haines AN, Gauthier DT, Nebergall EE, Cole SD, Nguyen KM, Rhodes MW, Vogelbein WK. First report of *Streptococcus parauberis* in wild finfish from North America[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 166(1/2): 270-275
- [6] Mohammed HH, Peatman E. Winter kill in intensively stocked channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Coinfection with *Aeromonas veronii*, *Streptococcus parauberis* and *Shewanella putrefaciens*[J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41(9): 1339-1347
- [7] Torres-Corral Y, Santos Y. Comparative genomics of *Streptococcus parauberis*: new target for molecular identification of serotype III[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(14): 6211-6222
- [8] Gao Y, Liu YK, Wang PM, Mo ZL, Li J, Liu SL, Li GY, Zhu M, Li J. Isolation, identification and vaccine development of serotype III *Streptococcus parauberis* in turbot (*Scophthalmus maximus*) in China[J]. Aquaculture, 2021, 538: 736525
- [9] Meng F, Kanai K, Yoshikoshi K. Characterization of drug resistance in *Streptococcus parauberis* isolated from Japanese flounder[J]. Fish Pathology, 2009, 44(1): 40-46
- [10] 周彪, 甄向凯, 欧阳松应. 噬菌体裂解酶应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9): 3330-3340
- [11] Zhou B, Zhen XK, Ouyang SY. Research progress in the application of bacteriophage lysin[J]. Microbiology China, 2021, 48(9): 3330-3340 (in Chinese)
- [12] Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(5): 393-400
- [13] 杜丽娟, 杨婷, 张宗德, 郭述良. 一种新型抗菌剂: 噬菌体裂解酶的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(7): 883-887
- [14] Du LJ, Yang T, Zhang ZD, Guo SL. Research progress of a novel antimicrobial agent-phage lytic enzyme[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2018, 43(7): 883-887 (in Chinese)
- [15] 刘畅, 沈瀚. 后抗生素时代的辅助抗菌策略研究进展[J]. 生物技术通讯, 2020, 31(6): 736-742
- [16] Liu C, Shen H. Advances of assisted antimicrobial strategies in the post-antibiotic era[J]. Letters in Biotechnology, 2020, 31(6): 736-742 (in Chinese)
- [17] Pritchard DG, Dong SL, Kirk MC, Cartee RT, Baker JR. LambdaSa1 and LambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(22): 7150-7154
- [18] Celia LK, Nelson D, Kerr DE. Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 130(1/2): 107-117
- [19] Oechslin F, Daraspe J, Giddey M, Moreillon P, Resch G. *In vitro* characterization of PlySK1249, a novel phage lysin, and assessment of its antibacterial activity in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* bacteremia[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(12): 6276-6283
- [20] Lood R, Raz A, Molina H, Euler CW, Fischetti VA. A highly active and negatively charged *Streptococcus pyogenes* lysin with a rare D-alanyl-L-alanine endopeptidase activity protects mice against

- streptococcal bacteremia[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(6): 3073-3084
- [18] Xiao YY, Chen R, Li M, Qi ZT, Yu YF, Pan ZH, Yao HC, Feng ZX, Zhang W. The effectiveness of extended binding affinity of prophage lysin PlyARI against *Streptococcus suis* infection[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(8): 5163-5172
- [19] Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. Nature Protocols, 2015, 10(6): 845-858
- [20] Matamp N, Bhat SG. Phage endolysins as potential antimicrobials against multidrug resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: current status of research and challenges ahead[J]. Microorganisms, 2019, 7(3): 84
- [21] Srinivasan R, Chaitanyakumar A, Subramanian P, Mageswari A, Gomathi A, Aswini V, Sankar AM, Ramya M, Gothandam KM. Recombinant engineered phage-derived enzymatic in *Pichia pastoris* X-33 as whole cell biocatalyst for effective biocontrol of *Vibrio parahaemolyticus* in aquaculture[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154: 1576-1585
- [22] Mishra A, Nam GH, Gim JA, Lee HE, Jo A, Kim HS. Current challenges of *Streptococcus* infection and effective molecular, cellular, and environmental control methods in aquaculture[J]. Molecules and Cells, 2018, 41(6): 495-505
- [23] Gilmer DB, Schmitz JE, Euler CW, Fischetti VA. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(6): 2743-2750
- [24] Huang L, Luo DH, Gondil VS, Gong YJ, Jia MH, Yan DZ, He J, Hu SC, Yang H, Wei HP. Construction and characterization of a chimeric lysin Cl_V with improved bactericidal activity against *Streptococcus agalactiae* *in vitro* and *in vivo*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(4): 1609-1619
- [25] Pritchard DG, Dong SL, Baker JR, Engler JA. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30[J]. Microbiology, 2004, 150(7): 2079-2087
- [26] Gu JM, Xu W, Lei LC, Huang J, Feng X, Sun CJ, Du CT, Zuo J, Li Y, Du TF, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(1): 111-117
- [27] Daniel RM, Peterson ME, Danson MJ, Price NC, Kelly SM, Monk CR, Weinberg CS, Oudshoorn ML, Lee CK. The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity[J]. The Biochemical Journal, 2009, 425(2): 353-360
- [28] Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia[J]. Infection and Immunity, 2003, 71(11): 6199-6204
- [29] Fenton M, Ross RP, McAuliffe O, O'Mahony J, Coffey A. Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAPK[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(4): 1025-1035
- [30] Zhao YJ, Zhang YH, Cao Y, Qi JX, Mao LW, Xue YF, Gao F, Peng H, Wang XW, Gao GF, et al. Structural analysis of alkaline β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5: implications for adaptation to alkaline conditions[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e14608
- [31] Filatova LY, Donovan DM, Foster-Frey J, Pugachev VG, Dmitrieva NF, Chubar TA, Klyachko NL, Kabanov AV. Bacteriophage phi11 lysin: physicochemical characterization and comparison with phage phi80 α lysin[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2015, 73/74: 51-58
- [32] Gu JM, Feng YG, Feng X, Sun CJ, Lei LC, Ding W, Niu FF, Jiao LY, Yang M, Li Y, et al. Structural and biochemical characterization reveals LysGH15 as an unprecedented "EF-hand-like" calcium-binding phage lysin[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(5): e1004109
- [33] Loessner MJ, Wendlinger G, Scherer S. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes[J]. Molecular Microbiology, 1995, 16(6): 1231-1241
- [34] Xu XL, Zhang DD, Zhou B, Zhen XK, Ouyang SY. Structural and biochemical analyses of the tetrameric cell binding domain of Lys170 from enterococcal phage F170/08[J]. European Biophysics Journal, 2021, 50(5): 721-729
- [35] Roach DR, Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications[J]. Bacteriophage, 2015, 5(3): e1062590
- [36] Zhang HM, Buttaro BA, Fouts DE, Sanjari S, Evans BS, Stevens RH. Bacteriophage ϕ Ef11 ORF28 endolysin, a multifunctional lytic enzyme with properties distinct from all other identified *Enterococcus faecalis* phage endolysins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(13): e00555-19